

機関番号：32660

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770054

研究課題名（和文）花粉管先端生長における活性酸素種生成酵素の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of NADPH oxidase, Rboh protein on pollen tube tip growth

研究代表者

賀屋 秀隆 (KAYA HIDETAKA)

東京理科大学・理工学部・助教

研究者番号：80398825

研究成果の概要（和文）：

花粉管が伸びるメカニズムを明らかにすることを目的に、シロイヌナズナの *AtRbohH*, *AtRbohJ* 遺伝子に着目し、これらの機能解析をおこなった。*AtRbohH*, *AtRbohJ* 蛋白質ともに、活性酸素種を生成する活性を持つことを明らかにした。また、*AtRbohH*, *AtRbohJ* 遺伝子は、花粉管での活性酸素種生成、先端生長において必要であることも明らかにした。これらにより、*AtRbohH*, *AtRbohJ* により生成された活性酸素種は、花粉管の先端生長に重要な機能を果たすことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

This study has been focused on the functions of NADPH oxidase on pollen tube growth. I analyzed the functions of *AtRbohH* and *AtRbohJ* genes that encode NADPH oxidase in *Arabidopsis*. I showed that both proteins have ROS (reactive oxygen species)-producing activities as NADPH oxidase using a heterologous expression system. Also I showed that both genes specifically expressed in pollen. *atrbohH* and *atrbohJ* double mutant was defective in pollen tube tip growth. These results suggest that ROS produced by *AtRbohH* and *AtRbohJ* play a critical role in the pollen tube tip growth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：植物分子，形態形成，シロイヌナズナ，活性酸素種，シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

花粉は、雌しべの先の柱頭に受粉すると、花粉管をのぼし、精細胞を胚珠まで運搬する。花粉管の伸長は、花粉細胞表層の一部に極性が形成されることで始まる。そこから、一方

向に先端生長し、胚珠に至るまでつづく。しかし、花粉管がどのようなメカニズムで一方向に先端生長をつづけるのか、不明な点が多くある。

シロイヌナズナの花粉管先端部では、活性

酸素種が蓄積しており、この蓄積は NADPH oxidase の阻害剤である DPI (diphenyleneiodonium) により阻害される。さらに DPI は花粉管の先端生長も阻害する (Potocky *et al.*, New Phytol, 2007)。このことは、花粉管先端部で、NADPH oxidase により生成される活性酸素種が、花粉管の先端生長に重要であることを示唆している。しかし、花粉管先端部で活性酸素種を生成する酵素は同定されておらず、どのようなメカニズムで活性酸素種を形成するのかについては不明であった。

2. 研究の目的

植物には NADPH oxidase をコードする遺伝子として *Rboh* 遺伝子があり、シロイヌナズナのゲノムには *AtRbohA-J* の 10 種が存在する。マイクロアレイデータにより、*AtRbohH* と *AtRbohJ* 遺伝子が花粉で発現する可能性が示唆されていた。本研究では、花粉管先端生長における NADPH oxidase の役割を明らかにすることを目的に、*AtRbohH*, *AtRbohJ* 遺伝子に着目し、両者が活性酸素を生成する酵素として機能するのか、花粉管の先端生長において機能しているのかを調べた。

3. 研究の方法

(1) *AtRbohH*, *AtRbohJ* の活性酸素種生成活性の測定

ヒト培養細胞 HEK293T 細胞に、シロイヌナズナ由来の *AtRbohH* あるいは *AtRbohJ* 遺伝子を一過的に異種発現させ、活性酸素種の生成を測定した。測定の際、異種発現させた細胞に、 Ca^{2+} イオノフォアであるイオノマイシンあるいは、蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤であるカリクリン A を添加した。活性酸素種の定量は、ペルオキシダーゼ・ルミノール発光法によりおこなった。

(2) シロイヌナズナ *atrbohH*, *atrbohJ* T-DNA 挿入突然変異体の表現型解析

AtRbohH, *AtRbohJ* 遺伝子に T-DNA が挿入された突然変異体を用いて、表現型を解析した。その際、両遺伝子の二重突然変異体も作成し、表現型を解析した。

4. 研究成果

(1) Ca^{2+} による *AtRbohH*, *AtRbohJ* の活性化

AtRbohH あるいは *AtRbohJ* を異種発現させた HEK293T 細胞に、イオノマイシンを添加したところ、一過的な活性化が見られた。これにより、*AtRbohH*, *AtRbohJ* は Ca^{2+} により一過的に活性化することを示唆した。また、*AtRbohH*, *AtRbohJ* の N 末端領域にある EF-hand モチーフに点突然変異を導入したところ、イオノマイシンによる活性化は消失した。この結果は、 Ca^{2+} による活性化は EF-hand モチーフへの Ca^{2+} 結合によるものであることを示唆した。

(2) 蛋白質リン酸化による *AtRbohH*, *AtRbohJ* の活性化

AtRbohH あるいは *AtRbohJ* を異種発現させた HEK293T 細胞に、蛋白質リン酸化を促進させるカリクリン A を添加したところ、イオノマイシン添加とは異なり、持続的な活性化が見られた。このことから、*AtRbohH*, *AtRbohJ* 共に蛋白質リン酸化により活性化されることを示唆した。

(3) 蛋白質リン酸化と Ca^{2+} による *AtRbohH*, *AtRbohJ* の相乗的活性化

カリクリン A あるいは、イオノマイシンにより、活性化されることを明らかにした。そこで、両者による活性化を調べた。カリクリン A 添加後にイオノマイシンを添加すると、それぞれ単独による活性化よりも、顕著に活

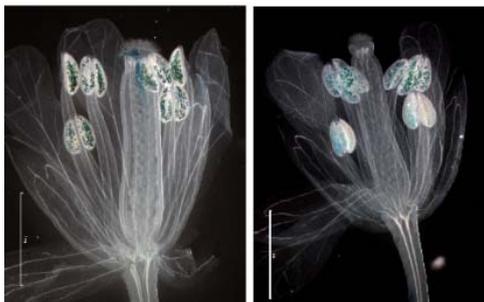
性化されることを明らかにした。このことは、蛋白質リン酸化と Ca^{2+} により相乗的に活性化されることを示唆した。

(4) *AtRbohH*, *AtRbohJ* の NADPH oxidase 活性

花粉管先端での活性酸素種の蓄積は、NADPH oxidase 阻害剤の DPI によって阻害される。そこで、*AtRbohH* あるいは *AtRbohJ* を異種発現させた HEK293T 細胞を DPI で処理した後、イオノマイシン誘導による活性酸素種の生成を調べた。その結果、花粉管での効果と同じで、DPI によって活性酸素種の生成が抑制された。このことは、*AtRbohH*, *AtRbohJ* ともに NADPH oxidase 活性を持つことを示している。

(5) *AtRbohH*, *AtRbohJ* 遺伝子の発現解析

組織別 RT-PCR および promoter::GUS による発現解析により、*AtRbohH*, *AtRbohJ* 遺伝子は、花粉および、先端生長している花粉管で特異的に発現していることを明らかにした。



AtRbohH-pro::GUS *AtRbohJ*-pro::GUS

図 シロイヌナズナの花。青色は、*AtRbohH*, *AtRbohJ* 遺伝子が発現している場所を示している。花は、観察しやすくするため、エタノールにより脱色した。

(5) 花粉管における *atrbohH*, *atrbohJ* 突然変異体の表現型解析

AtRbohH, *AtRbohJ* 遺伝子に T-DNA が挿入された突然変異体をそれぞれ 2 株ずつ同定し

た。各突然変異体では、*AtRbohH*, *AtRbohJ* 遺伝子は発現していないことから、機能欠損突然変異体であることを確認した。それぞれ *atrbohH*, *atrbohJ* 突然変異体は野生型と比較して、顕著な異常は認められなかった。そこで、*atrbohH*; *atrbohJ* 二重突然変異体を作成し、表現型を解析した。二重突然変異体でも、顕著な形態異常は見られなかったが、稔性低下の異常が見られた。二重突然変異体の花粉を野生型の雌しべに受粉させても、同様の稔性異常が見られた。このことは、花粉に異常があることを示している。次に、アニリンブルー染色により花粉管を蛍光顕微鏡により観察したところ、花粉管の伸長に異常が見られた。これらのことから、*AtrbohH*, *AtrbohJ* 遺伝子は、花粉管の先端生長において冗長的に機能していることを明らかにした。

(6) 花粉管の先端生長における *AtRbohH*, *AtRbohJ* の役割

AtRbohH, *AtRbohJ* 蛋白質は、活性酸素種を生成する活性を持つこと。 Ca^{2+} と蛋白質リン酸化により活性化されることを示した。並行して、*atrbohH*; *atrbohJ* 二重突然変異体では、花粉管の先端生長の異常が原因で稔性が低下することを明らかにした。また、*AtRbohH*, *AtRbohJ* は膜貫通ドメインを持つことから、膜局在蛋白質であると考えられる。花粉管の先端では、細胞内 Ca^{2+} のオシレーションが観察され、花粉管の先端生長においてこのオシレーションが重要であると考えられている。これらのことから、花粉管が伸長するメカニズムとして、次のようなモデルが提唱できる。花粉管の先端の膜に *AtRbohH*, *AtRbohJ* が局在し、花粉管の先端生長に必要な活性酸素種を生成し、供給している。この活性酸素種の供給は、細胞内 Ca^{2+} のオシレーションにより制御されている。

(7) 今後の展望

AtRbohH, AtRbohJをリン酸化する酵素の同定. 活性酸素種生成とCa²⁺のオシレーションの相関. この相関に関わると考えられるCa²⁺チャンネルの同定. これらを行うことにより, 花粉が伸びていくメカニズムの詳細が明らかになると考えている.

また, 花粉症の原因に, 花粉が生成する活性酸素種が関与しているとの報告がある. 本研究を進めることにより, 花粉症を抑制する医薬品の開発につながることも期待される.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計0件)

〔学会発表〕 (計2件)

Hidetaka Kaya, Functional characterization and diversity of Arabidopsis NADPH oxidase proteins, AtrbohA-J, involved in production of reactive oxygen species, The 9th International Plant Molecular Biology (IPMB) Congress, 2009年10月25-30日, America's Center, St. Luis, Missouri, USA

中島 諒, 花粉特異的に発現するシロイヌナズナの活性酸素種生成酵素 AtrbohH, AtrbohJの機能解析, 日本植物学会第74回大会, 2010年9月9日, 中部大学 (愛知県)

〔図書〕 (計1件)

著者名: 賀屋秀隆・木村幸恵・朽津和幸

出版社: 羊土社

書名: 実験医学 増刊 活性酸素シグナルと酸化ストレス 第1章-10 植物のストレス応答・形態形成における活性酸素種の積極的生成とその制御

発行年: 2009年 ページ: 2382-2389 (84-91)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

なし

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

賀屋 秀隆 (Kaya Hidetaka)

東京理科大学・理工学部・助教

研究者番号: 80398825

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

木村 幸恵 (Kimura Sachie)

東京理科大学・大学院理工学研究科

・博士課程

研究者番号: なし

河原崎 朋子 (Kawarazaki Tomoko)

東京理科大学・大学院理工学研究科

・博士課程

研究者番号: なし

先崎 栄里子 (Senzaki Eriko)

東京理科大学・大学院理工学研究科

・修士課程

研究者番号: なし

路川 真貴 (Michikawa Masataka)

東京理科大学・大学院理工学研究科
・修士課程
研究者番号：なし

今井 亜耶 (Imai Aya)
東京理科大学・大学院理工学研究科
・修士課程
研究者番号：なし

新堀 仁美 (Nibori Hitomi)
東京理科大学・大学院理工学研究科
・修士課程
研究者番号：なし

中島 諒 (Nakajima Ryo)
東京理科大学・大学院理工学研究科
・修士課程
研究者番号：なし

飯塚 文子 (Iizuka Ayako)
東京理科大学・理工学部・学士課程
研究者番号：なし

森 恭一郎 (Mori Kyo-ichiro)
東京理科大学・理工学部・学士課程
研究者番号：なし